

Vieira *et al.* Diagnósticos molecular e citológico de Herpesvirus felino Tipo 1, *Chlamydomphila felis* E *Mycoplasma felis*, em gatos com conjuntivite e/ou doença do trato respiratório superior

## DIAGNÓSTICOS MOLECULAR E CITOLÓGICO DE HERPESVIRUS FELINO TIPO 1, *Chlamydomphila felis* E *Mycoplasma felis*, EM GATOS COM CONJUNTIVITE E/OU DOENÇA DO TRATO RESPIRATÓRIO SUPERIOR

### MOLECULAR AND CYTOLOGICAL DIAGNOSIS OF FELINE HERPESVIRUS 1, *Chlamydomphila felis* AND *Mycoplasma felis*, IN CATS WITH CONJUNCTIVITIS AND/OR UPPER RESPIRATORY TRACT DISEASE

M. Vieira<sup>1</sup>, J. Fonseca<sup>1</sup>, L. Antunes<sup>2</sup>, C. Albuquerque<sup>2,3</sup>, O. Almeida<sup>1</sup>, M. Alves<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias (ULHT). Campo Grande, 376, 1749-024 Lisboa, Portugal; <sup>2</sup> Hospital Veterinário de Leiria. Travessa Cidade de Rheine, Lote 2, loja a/b, 2410-270 Leiria, Portugal; <sup>3</sup> MGPATAS. Rua 1º de Maio, 4, 2430-023 Marinha Grande, Portugal; <sup>4</sup> CBIOS - Research Centre for Biosciences and Health Technologies – ULHT

**Resumo:** A doença do trato respiratório superior (DTRS), apesar de muito comum em gatos, é frequentemente subvalorizada. Os sinais clínicos apresentados com mais frequência são espirros, tosse, secreção ocular e/ou nasal e conjuntivite. A conjuntivite felina apresenta, maioritariamente, uma natureza infecciosa, tendo como principais responsáveis o Herpesvírus felino-1, *Chlamydomphila felis* e, possivelmente, *Mycoplasma felis*. Por vezes, o diagnóstico pode tornar-se desafiante, quer pela natureza dos agentes, quer pelos sinais clínicos inespecíficos. Os objetivos do presente trabalho foram: i) realizar o diagnóstico da infeção por estes agentes, através da citologia conjuntival e da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), em gatos com sinais clínicos de DTRS e/ou de conjuntivite e ii) avaliar a concordância entre os resultados do diagnóstico molecular e citológico. Para tal, numa população de 29 gatos com sinais clínicos de DTRS e/ou conjuntivite, foram realizadas duas recolhas de amostras conjuntivais, uma com zaragatoas e outra com escova de citologia, para os diagnósticos molecular e citológico, respetivamente. As citologias foram coradas pelo método de May Grunwald-Giemsa. Para cada amostra, procedeu-se a duas PCR convencionais, para amplificação do DNA de FHV-1 e *M.felis* e uma PCR em tempo real, para deteção de DNA de *C. felis*. Ao diagnóstico molecular, foi obtida uma frequência de infeção de 58,6% para FHV-1 e de 31,0% para *C. felis*. Não foi identificado nenhum gato com infeção por *M. felis*. No diagnóstico citológico conjuntival, apenas seis animais foram diagnosticados com *C. felis*, não tendo sido feita nenhuma observação suspeita de infeção para os restantes agentes. Os resultados evidenciaram uma elevada frequência de infeção por FHV-1 e *C. felis*. A PCR mostrou ser um meio de diagnóstico mais sensível para a deteção dos agentes em estudo, quando comparada com a citologia conjuntival. O presente estudo deixa em aberto a dúvida sobre o papel de *M. felis* enquanto agente etiológico primário na conjuntivite e DTRS.

**Palavras-chave:** Doença do trato respiratório superior, Conjuntivite, Herpesvirus felino-1, *Chlamydomphila felis*, *Mycoplasma felis*, citologia conjuntival, diagnóstico molecular.

**Abstract:** Upper respiratory tract disease (URTD) is very usual in cats, but quite often underestimated. Main clinical signs are sneezes, cough, ocular and/or nasal secretions and conjunctivitis. Feline conjunctivitis has, mostly, an infectious etiology with feline-1 herpesvirus, *Chlamydomphila felis* and, possibly, *Mycoplasma felis* as the main causative agents. Diagnosis can, sometimes, become challenging, both by the nature of the agents and the nonspecific clinical signs. The goals of this study were: i) to diagnose these agents through conjunctival cytology and Polymerase Chain Reaction (PCR), in cats with clinical signs of URTD and/or conjunctivitis and ii) to evaluate the concordance of molecular and cytological results. For this purpose, in a population of 29 cats with clinical signs of URTD and/or conjunctivitis, two conjunctival samples were taken, one with a swab, for PCR and another with a cytology brush, for cytological evaluation. Cytologies were stained with May Grunwald-Giemsa. Two conventional PCRs, for FHV-1 and *M. felis*, and a real-time PCR for *C. felis*, were performed for each sample. By PCR, an infection frequency of 58.6% was obtained for FHV-1 and 31.0% for *C. felis*. *M. felis* DNA was not detected in all animals. In the conjunctival cytologic diagnosis, only six animals were positive to *C. felis* and no signs suggestive of infection were observed for the remaining agents. The results evidenced a high frequency of infection by FHV-1 and *C. felis*. PCR has shown to be more accurate as a diagnostic tool for detecting the studied agents, compared to conjunctival cytology. This study also reinforces the doubt about the possibility of *M. felis* playing a primary role in both conjunctivitis and URTD.

**Keywords:** Upper respiratory tract disease, Conjunctivitis, Feline Herpesvirus-1, *Chlamydomphila felis*, *Mycoplasma felis*, Conjunctival cytology, Polymerase Chain Reaction.

## 1. INTRODUÇÃO

A Doença do Trato Respiratório Superior (DTRS) e a conjuntivite afetam frequentemente os gatos, podendo ter como principais responsáveis agentes como o Calicivirus Felino, o Herpesvirus Felino, *Chlamydomphila felis*, *Bordetella bronchiseptica* e, possivelmente, *Mycoplasma* spp. (Helps et al., 2005; Turner, 2010a; Lee-Fowler, 2014).

Estes agentes encontram-se, muitas vezes, associados, dando origem a co-infecções (Turner, 2010a; Fernandez et al., 2017). Além destas etiologias infecciosas, as conjuntivites podem ter, também, uma componente alérgica, neoplásica, traumática (por corpo estranho), ou serem secundárias a outras doenças oculares (Maggs, 2008; Turner, 2010a).

Dois dos exames complementares de diagnóstico mais utilizados para o diagnóstico de FHV-1, *C. felis* e *M. felis*, são a citologia conjuntival e a Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR). A citologia conjuntival constitui uma técnica não invasiva, pouco

dispendiosa, de fácil execução, que possibilita a obtenção rápida de resultados, permitindo não só a deteção de alguns agentes etiológicos, como a caracterização do tipo e fase do processo inflamatório presente (Ollivier et al., 2007; Turner, 2010b; Raskin, 2016). Embora útil, este método de diagnóstico apresenta alguns inconvenientes, como o facto de depender da experiência do citologista para avaliar os resultados e do Médico Veterinário que faz a recolha, uma vez que uma amostra com pouca celularidade pode não ser representativa e originar resultados inconclusivos (Prasse & Young, 2010). Este método de diagnóstico apresenta menor especificidade e sensibilidade do que a PCR (Sykes, 2004; Rand, 2006; Gruffydd-Jones et al., 2009; Lee-Fowler, 2014). Deste modo, por vezes, a citologia conjuntival pode, por si só, não ser suficiente para chegar a um diagnóstico definitivo (Prasse & Young, 2010).

Do ponto de vista citológico, a infeção por *Chlamydomphila felis* é caracterizada pela presença de corpos de inclusão intraplasmocitários basofílicos dentro das

células epiteliais, arredondadas, com diâmetro mínimo de 3 µm, por norma adjacentes ao núcleo. Estas inclusões podem ter distintas apresentações, variando entre uma apresentação finamente granular a granular, porém mais grosseira, interpretada como um aglomerado de corpos elementares, assemelhando-se ao corpo reticulado (Ramsey, 2000; Rand, 2006; Hillstrom et al., 2012). Inicialmente é comum existir uma predominância de neutrófilos; porém, a partir dos 14-21 dias após a infeção, é frequente encontrarem-se macrófagos e linfócitos (Hoover et al., 1978; Ramsey, 2000; Sykes, 2005). Hillstrom et al. (2012), descreveram inflamação moderada a grave em animais com infeção por *C.felis*. A citologia só deve ser considerada positiva quando é possível visualizar um elevado número de inclusões típicas, pois as inclusões podem ser confundidas com grânulos de melanina, bactérias, inclusões induzidas por alguns medicamentos ou até pela extrusão de conteúdo nuclear, aquando da recolha/distribuição de células na lâmina e dar origem a resultados falso positivos (Von Bomhard et al., 2003; Hillstrom et al., 2012).

À observação microscópica, *M. felis* tem a aparência de cocos ou cocobacilos, agrupados na periferia das células. Quando comparados com os corpos de inclusão de *C.felis*, são menos basofílicos e menos granulares. A inflamação é, com frequência, caracterizada como neutrofílica e varia de moderada a grave. Linfócitos e eosinófilos são incomuns neste tipo de infeção (Hillstrom et al., 2012).

Embora muito pouco comuns, em infeções por FHV-1, podem visualizar-se inclusões virais intranucleares, utilizando a coloração de May-Grunwald Giemsa (Volopich et al., 2005; Hillstrom et al., 2012). A reação de PCR, consiste na amplificação exponencial de fragmentos específicos de DNA, permitindo a sua deteção, mesmo quando presente em pequena quantidade. Esta técnica apresenta uma elevada especificidade e sensibilidade (Dewhurst et al., 2012). A alta sensibilidade e especificidade da PCR, faz com que esta seja, actualmente, considerada a

técnica de eleição para deteção de FHV-1, *C. felis* e *M. felis* (Ramsey, 2000; Sjö Dahl-Essén et al., 2008; Gould, 2011; Lee-Fowler, 2014).

O presente estudo teve como objectivo realizar, em gatos com DTRS e/ou conjuntivite, o diagnóstico molecular e citológico para Herpesvírus felino-1, *Chlamydomphila felis* e *Mycoplasma felis* e comparar os achados citológicos com os resultados da PCR.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

No presente trabalho foram estudados 29 gatos com sinais clínicos indicativos de conjuntivite e/ou sinais de doença do trato respiratório superior. Foram considerados animais com conjuntivite, todos aqueles que apresentaram corrimento ocular, hiperemia e/ou quemose. Os critérios de inclusão para os animais com doença do trato respiratório superior foram tosse, espirros e secreção oronasal/nasal. Os tutores de todos os animais assinaram um consentimento informado, autorizando a sua inclusão no estudo. O estudo foi, previamente, aprovado pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal (CEBEA) da Faculdade de Medicina Veterinária (FMV) da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias (ULHT).

A recolha das amostras decorreu entre os meses de janeiro e maio de 2018, no Hospital Veterinário de Leiria e no Hospital Veterinário da FMV-ULHT.

De forma a garantir uma técnica de colheita o mais uniforme possível, foram dadas instruções detalhadas aos veterinários que colheram as amostras. A cada gato foram feitas duas recolhas distintas, uma com zaragatoa estéril, para realização da PCR, e outra com uma escova de citologia, para a avaliação citológica. Sempre que possível, a recolha de amostras foi realizada em ambos os olhos. No total, foram recolhidas 56 amostras com zaragatoa estéril, para análise molecular e igual número com escova citológica.

A zaragatoa estéril foi colocada num microtubo e armazenada a – 20°C até ser processada. O material colhido com escova de

citologia foi transferido para uma lâmina de vidro e deixado secar ao ar, à temperatura ambiente. Posteriormente, foi feita uma coloração do tipo Romanowsky (MGG Quick Stain, Bio-Optica, Milan, Italy). A avaliação microscópica das citologias, foi realizada no laboratório do Hospital Escolar da FMV-ULHT, sempre pelo mesmo patologista clínico, recorrendo às ampliações de 100×, 400× e 1000×. As amostras foram analisadas e classificadas quanto ao tipo de inflamação e à presença ou ausência de inclusões citoplasmáticas. Este processo foi realizado sem qualquer conhecimento da história, sinais clínicos ou outra informação sobre os gatos.

O DNA das amostras em estudo foi extraído a partir das zaragatoas conjuntivais tendo, para o efeito, sido utilizado o Kit RTP<sup>®</sup> Bacteria DNA Mini Kit (Strattec Molecular), de acordo com as indicações do fabricante.

O DNA foi submetido a várias reacções de PCR, para amplificação do DNA dos vários agentes, tendo, para o efeito, sido utilizado um termociclador Rotor Gene-Q (QIAGEN<sup>®</sup>). Em todas as reacções foram sempre incluídos um controlo positivo e dois controlos negativos.

Em todas as amostras, com a finalidade de avaliar a inexistência de inibidores da DNA polimerase, amplificou-se, por PCR convencional, um fragmento de 177 bp do gene beta-glucoronidase felino (fGUSB). Para tal, foi preparado um volume total de 25 µL de uma mistura reaccional contendo 1x MyTaq Reaction Buffer (Bioline<sup>®</sup>), 1 U de MyTaq DNA Polymerase (Bioline<sup>®</sup>), 10 pmol de cada primer (Fw: GCGTTCCTTTTGCGAGAGAG; Rev: GCTGTGGAAGTTGCCCTTA), 10 µL de DNA e água desionizada estéril até perfazer o volume final. As condições da reacção de PCR consistiram na desnaturação inicial a 95 °C, durante 1 min., seguida de 30 ciclos a 95°C, durante 20 seg., 55 °C, durante 20 seg. e 72 °C, durante 20 seg.; a reacção terminou após uma extensão final a 72 °C, durante 5 minutos. Para visualizar os produtos de PCR, procedeu-se à sua electroforese em gel de agarose a 1,5 % (m/V).

Com o intuito de verificar a existência de DNA de Herpesvírus felino tipo 1, realizou-se uma PCR convencional, de modo a amplificar um fragmento de 95 pb do gene timidina cinase (TK). Para a reacção utilizou-se um volume de 25 µL de mistura reaccional, que continha 1x MyTaq Reaction Buffer (Bioline<sup>®</sup>), 1 U MyTaq DNA Polymerase (Bioline<sup>®</sup>), 10 pmol de cada primer (Helps et al., 2003), 10 µL de DNA de cada amostra e água desionizada estéril de forma perfazer o volume pretendido. As condições da reacção de PCR consistiram numa desnaturação inicial a 95°C, durante 5 min., seguida de 30 ciclos a 95°C, durante 45 seg., 51°C, durante 30 seg. e a 72°C, durante 20 seg.; a reacção terminou após uma extensão final a 72°C, durante 5 minutos. A visualização dos resultados foi feita após electroforese em gel de agarose a 2,8% (m/V).

Para avaliar a presença de Mycoplasma felis nas amostras, foi realizada uma PCR convencional tendo como alvo um fragmento de 238 pb, do gene que codifica a subunidade 16S do rRNA. A mistura reaccional da reacção de PCR preparada, num volume final de 25 µL, continha, além de 10 µL DNA, 1x MyTaq Reaction Buffer (Bioline<sup>®</sup>), 1 U de MyTaq DNA Polymerase (Bioline<sup>®</sup>), 10 pmol de cada primer (Myc1 e MfelR1) (Chalker et al., 2004) e água destilada estéril até perfazer o volume final. As condições da reacção de PCR consistiram numa desnaturação inicial a 95°C, durante 5 min., seguida de 30 ciclos a 95°C, durante 45 seg., 52°C, durante 30 seg. e 72°C, durante 20 seg.; a reacção terminou após uma extensão final a 72°C, durante 5 minutos. Os produtos da reacção de PCR, foram visualizadas após electroforese em gel de agarose a 1,5% (m/V).

A presença de DNA de Chlamydomphila felis, foi avaliada através de PCR em tempo real e de PCR touchdown seguido de restrição enzimática. A PCR em tempo real foi realizada para amplificar um fragmento de 77 pb do gene que codifica uma proteína da membrana externa de tipo A (OmpA). Para a reacção utilizou-se um volume de 20 µL de mistura reaccional, que continha 5 µL do DNA

em estudo, 10µL de 2x SensiFAST SYBR No-ROX Mix (Bioline®), 4,0 µL de água desionizada estéril e 0,5µL de cada primer (Helps et al., 2003). Cada amostra, foi realizada em duplicado ou triplicado. As condições da reacção de PCR consistiram numa desnaturação inicial a 95°C, durante 3 min., seguida de 40 ciclos a 95°C, durante 5 seg., 62°C, durante 10 seg. e 72°C, durante 8 seg.. As amostras com um valor de  $C_T$  inferior ou igual a 37 foram consideradas positivas. Para confirmar a especificidade da amplificação com SYBR® Green, realizou-se, imediatamente após a reacção de PCR, uma curva de melting, fazendo variar a temperatura entre 55°C e 94°C, com incrementos de 1°C em cada ciclo. Os resultados foram analisados com recurso ao software Rotor-Gene Q – Pure Detection V 2.1.0. A confirmação da espécie de *Chlamydia* responsável pela infecção foi, ainda, realizada por PCR touchdown, seguida de restrição com a enzima Hinf-I. Esta PCR amplifica um fragmento de 269 pb do gene 16S rDNA nos organismos pertencentes à família Chlamydiaceae (Ossewaarde & Meijer, 1999). Para a reacção, foram utilizados 25 µL de mistura reaccional, contendo 1 x MyTaq Reaction Buffer (Bioline®), 1 U de MyTaq DNA polimerase (Bioline®), 10 pmol de cada primer (Ossewaarde & Meijer, 1999), 10 µL de DNA de cada amostra e água desionizada estéril até perfazer o volume final. As condições da reacção de PCR consistiram numa desnaturação inicial a 94°C, durante 2 min., seguida de 10 ciclos a 94°C, durante 30 seg., 56°C, durante 30 seg. e 72°C, durante 30 segundos. Seguiram-se mais 10 ciclos a 94°C, durante 30 seg., 52°C, durante 30 seg. e 72°C, durante 30 seg.; a reacção terminou após uma extensão final a 72°C, durante 5 minutos. Os produtos assim amplificados foram submetidos a hidrólise com a enzima de restrição Hinf-1 (Thermo Scientific). Quando a espécie presente é *C. felis*, a hidrólise com Hinf-I origina três fragmentos com 145, 73 e 51 pares de bases. A reacção de hidrólise efectuou-se de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos de hidrólise foram

visualizados após electroforese em gel de agarose a 3% (m/V).

### 3. RESULTADOS

A amplificação do gene beta-glucoronidase felino foi bem-sucedida em todas as amostras tendo, assim, sido possível inferir sobre a ausência de inibidores da DNA polimerase.

#### *Diagnóstico de FHV-1*

Em 58,6% (17/29) dos gatos em estudo foi possível amplificar DNA de FHV-1. Desses 17 animais, 52,9% (9/17) apresentaram resultado positivo em ambos os olhos e os restantes 47,1% (8/17) em, apenas, um dos olhos.

Na citologia conjuntival não foram visualizadas inclusões virais suspeitas de infecção por FHV-1. Em sete (41,2%) dos 17 animais positivos ao diagnóstico molecular, não se visualizaram células inflamatórias. Nos restantes, foi observada inflamação neutrofílica e/ou linfocítica.

#### *Diagnóstico de M. felis*

Na reacção de PCR convencional não foi amplificado DNA de *M. felis* em nenhuma das amostras, tendo todas elas sido consideradas negativas.

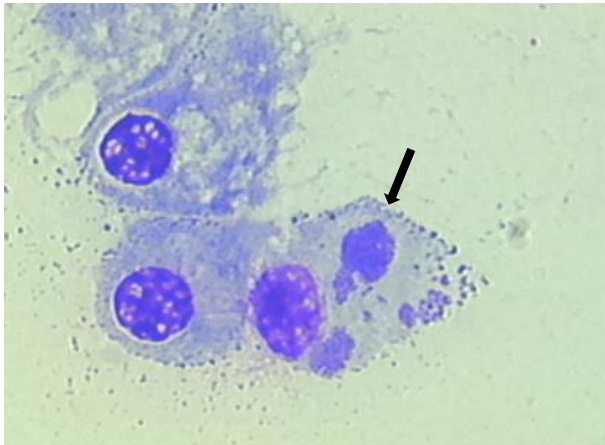
Não foram visualizadas inclusões intracitoplasmáticas suspeitas de infecção por *M. felis* em nenhum dos animais estudados.

#### *Diagnóstico de C. felis*

A PCR em tempo real para detecção de *C. felis* foi positiva em nove (31,0%) dos 29 gatos em estudo. A PCR *touchdown* seguida de restrição por *Hinf-I* permitiu confirmar a identidade da espécie infectante como sendo *C. felis*. De entre os nove gatos infetados com *C. felis*, três (33,3%) tinham uma apresentação unilateral e os restantes seis (66,7%) bilateral.

Em seis gatos positivos por PCR, foram visualizadas, em pelo menos um dos olhos, inclusões intracitoplasmáticas suspeitas de infecção por *C. felis* (figura 1). Estas foram detetadas, apenas, em um animal, de modo

bilateral. Em três dos nove animais positivos ao diagnóstico molecular (33,3%), não se visualizaram células inflamatórias. Nos restantes, foram detetadas, com igual frequência (22,2%, 2/9), inflamação neutrofílica e/ou linfocítica.



**Figura 1** – Citologia conjuntival corada com May Grunwald-Giemsa QUICK STAIN, onde se observa inclusão intracitoplasmocitária de *C. felis* (seta) (objetiva de 100x). Original.

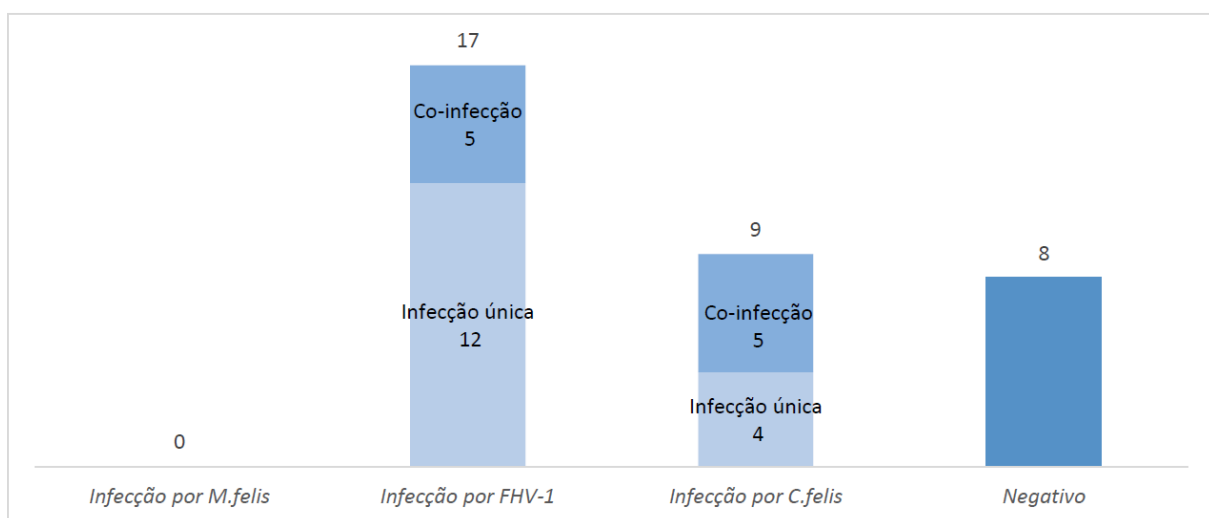
#### Presença de co-infecções

Em 17,2% (5/29) dos gatos em estudo foi possível amplificar DNA de FHV-1 e de *C.felis*, isto é, 29,4% (5/17) dos animais infetados por FHV-1 e 55,5% (5/9) dos animais infetados por *C.felis*, estavam co-infetados (figura 2).

#### 4. DISCUSSÃO

No presente estudo, FHV-1 foi o agente etiológico detetado em maior número de gatos ( $n=17$ ), tal como esperado, pois este encontra-se descrito como sendo a maior causa de conjuntivite crónica e aguda nesta espécie (Nasisse *et al.*, 1993). A taxa de infecção detetada para o agente foi de 58,6%. Este valor foi superior ao já descrito por Hartmann e colaboradores (2010), onde foi determinada uma prevalência de 27% (11/41), utilizando a mesma técnica e tendo o mesmo gene como alvo. Porém, o resultado obtido encontra-se dentro dos valores descritos por vários autores, entre 1% e 88,9%, utilizando diversos métodos de diagnóstico (Helps *et al.*, 2003; Volopich *et al.*, 2005; Low *et al.*, 2007; Fernandez *et al.*, 2017; Nguyen *et al.*, 2018).

Ao exame citológico, não foram visualizadas quaisquer inclusões virais, sugestivas de infecção por FHV-1. Este resultado comprova a baixa sensibilidade do diagnóstico citológico face ao diagnóstico molecular, como descrito na literatura, onde se relata que a visualização destas inclusões é pouco frequente (Volopich *et al.*, 2005; Amor, 2014, p.60; Hillstrom *et al.*, 2012). De entre os animais positivos para FHV-1 no diagnóstico molecular, 41,2% não apresentavam inflamação em nenhum dos olhos.



**Figura 2** –diagnóstico molecular para os agentes em estudo.

Hillstrom e colaboradores (2012), descrevem uma prevalência de 44% de animais positivos por PCR para FHV-1 sem evidência de inflamação ou, apenas, com inflamação ligeira.

A taxa de infecção por *C. felis* encontrada foi de 31,0%. Este valor situa-se próximo dos valores descritos na literatura. Diversos estudos epidemiológicos mostram prevalências entre 3,12% e 30% em animais que apresentam conjuntivite (Helps *et al.*, 2005; Low *et al.*, 2007; Baumworcel *et al.*, 2017; Fernandez *et al.*, 2017). Schulz e colaboradores (2015) obtiveram, por PCR, uma frequência de 35,6% (37/104) para *C. felis* em animais com DTRS, quando estudadas quatro amostras de diferentes locais (faringe, língua, nariz e conjuntiva) para cada animal. Considerando, apenas, os animais positivos em amostras retiradas da conjuntiva (tal como aconteceu no presente estudo), a frequência foi de, apenas, 24,0%.

De entre os animais com PCR positivo para *C. felis*, 66,6% apresentaram inclusões intracitoplasmáticas suspeitas de infeção por este agente. As prevalências encontradas na literatura variam entre 20% e 100%, para animais positivos por PCR (Hillstrom *et al.*, 2012; Amor, 2014, p.61; Anderlini *et al.*, 2018). As inclusões intracitoplasmáticas diagnósticas de *C. felis* são visualizadas com maior probabilidade entre os 7 e os 14 dias após a infeção, o que pode contribuir para a existência de resultados falso negativos, caso a citologia seja realizada fora deste intervalo de tempo (Ramsey, 2000; Rand, 2006; Hillstrom *et al.*, 2012). No presente trabalho, em 33,3% dos gatos positivos para *C. felis*, não foram visualizadas células inflamatórias. As inflamações neutrofílica bilateral, mista bilateral e mista unilateral apresentaram-se com a mesma frequência (22,2%). No estudo de Hillstrom e colaboradores (2012), todos os animais apresentavam inflamação, sendo que 37% dos mesmos apresentavam inflamação neutrofílica, 37% inflamação linfocítica e 25% inflamação mista. Estes resultados podem servir como referência; porém, não podem ser tidos como comparação direta, pois os autores apenas retiraram uma amostra

ao olho afetado com maior gravidade, ao passo que, no presente trabalho, existiu uma dinâmica uni/bilateral.

No presente trabalho não foram identificados gatos infectados com *M. felis*. Embora os organismos do género *Mycoplasma* sejam, frequentemente, encontrados, tanto em gatos sintomáticos, como assintomáticos, o seu papel como agente etiológico primário nas conjuntivites e na DTRS carece, ainda, de certezas, existindo estudos contraditórios Low *et al.*, 2007; Sjö Dahl-Essén *et al.*, 2008; Hillström *et al.*, 2012; Fernandez *et al.*, 2017). À semelhança dos resultados aqui apresentados, a ausência de infeção foi, também, descrita noutros estudos semelhantes (Sjö Dahl-Essén *et al.*, 2008; Amor, 2014). Embora a citologia conjuntival não seja tida como o método de diagnóstico mais eficaz para este agente, no presente estudo não foram encontrados organismos compatíveis com a infeção por *M. felis*, em nenhuma das amostras observadas, o que vai ao encontro dos resultados obtidos através da PCR.

Dos 29 gatos em estudo, apenas cinco (17,2%) foram positivos tanto para FHV-1 como para *C. felis*. Este valor está um pouco abaixo do descrito por Fernandez e colaboradores (2017), onde 35,4% (92/260) dos animais que apresentavam sintomatologia clínica, estavam co-infectados. De notar que este estudo incluía, não só um maior número de animais, como animais com sintomatologia de conjuntivite, DTRS e/ou gengivoestomatite, não especificando quantos animais co-infectados apresentavam sintomatologia de gengivoestomatite; assim, as duas populações não são comparáveis. Outro fator que pode justificar a discrepância entre resultados é o facto de o estudo de Fernandez e colaboradores (2017) incluir, também, o diagnóstico de Calicivírus felino. Num estudo levado a cabo por Lobova e colaboradores (2019), foi obtido um valor de 17,4% (38/218) para animais co-infectados. Este valor é semelhante ao obtido no presente estudo; porém, além dos agentes estudados no presente trabalho, os autores estudaram, também, Calicivírus felino e *Bordetella*

*bronchiseptica*, pelo que os valores devem ser comparados com cautela. Acresce, ainda, que o estudo de Lobova e colaboradores (2019) englobou, quer animais com sintomatologia clínica de DTRS, quer animais clinicamente saudáveis, isto é, a população em estudo é distinta da do presente trabalho.

Dos animais infetados por *C. felis*, 55,5% estavam co-infetados com FHV-1. Este valor está dentro dos valores descritos na literatura, que variam entre os 8% e os 64% (Wills *et al.*, 1988; Von Bomhard *et al.*, 2003).

Oito dos animais inseridos no estudo, não apresentaram resultado positivo para nenhum dos agentes estudados. Embora não possa ser colocada de parte a hipótese de resultados falso negativos devido, por exemplo, a recolha insuficiente da amostra e/ou à fase de latência característica de algumas destas infeções, existem outras etiologias que podem explicar os sinais clínicos apresentados por estes animais, nomeadamente, infecção por calicivírus, conjuntivite bacteriana, conjuntivite alérgica, corpo estranho/trauma, queratoconjuntivite seca, queratoconjuntivite eosinofílica ou neoplasia (ex: linfoma). A conjuntivite pode, ainda, ter na sua génese outras causas (por exemplo, alérgica ou neoplásica) ou ser confundida como consequência de outras doenças oculares que causam hiperemia conjuntival, como é o caso da uveíte (Maggs, 2008; Turner, 2010a; Hartley, 2014).

## 5. CONCLUSÃO

Com o presente trabalho foi possível, não só comprovar a origem infecciosa de grande parte dos casos de conjuntivite e/ou DTRS nos gatos em estudo, como conhecer melhor os seus agentes etiológicos e a abordagem ao seu diagnóstico. Tal como esperado, as etiologias não infecciosas mostraram-se pouco frequentes, dando ênfase ao papel dos agentes infecciosos nestas doenças. O FHV-1 foi o agente diagnosticado com maior frequência (58,6%), seguido de *Chlamydomphila felis* (31,0%). Este trabalho vem acentuar a dúvida relativa ao papel de *Mycoplasma felis* como

agente primário nas conjuntivites e DTRS, uma vez que este agente não foi diagnosticado em nenhum dos animais em estudo. A PCR mostrou-se o método de diagnóstico mais indicado para os agentes infecciosos estudados. Embora mais eficaz do que a citologia conjuntival, apresenta a desvantagem de ser uma técnica mais dispendiosa, o que a torna menos comum na prática clínica. Assim sendo, na impossibilidade de realizar PCR, a citologia conjuntival pode ser um bom aliado no diagnóstico de *C. felis* quando se encontram inclusões compatíveis; no entanto, se não se observarem inclusões, deve ter-se em consideração a existência de um elevado número de falsos negativos (33,3 %). Para o diagnóstico da infeção por FHV-1 e *M. felis*, a citologia não pareceu apresentar grande utilidade.

## REFERÊNCIAS

- Amor, D. (2014). Etiologia das conjuntivites felinas e abordagem ao seu diagnóstico (Dissertação de Mestrado). Universidade de Lisboa.
- Anderlini, G. P.O., Neto, J. E., Anderlini, G. A., Omena, P. N.M, Souza, E.H.L.S., da Silva, J. K. A., Barbosa, S.M.V, et al. (2018). Estudo clínico-oftálmico e citológico de felinos domésticos com conjuntivite e mantidos em adensamento populacional. PubVet, 12(8), 1-8.
- Baumworcel, N., Soares, A.N.M., Silva, S.B., Almeida, N.K.O, Castro, T.X. (2017). Correlation between clinical signs of feline conjunctivitis and molecular detection of felid herpesvirus-1, feline calicivirus, Chlamydomphila felis and Mycoplasma felis in cats from shelters in Rio de Janeiro. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci., 54(1), 18-26.
- Chalker, V.J., Owen, W.M., Paterson, C.J., Brownlie, J. (2004). Development of a polymerase chain reaction for the detection of Mycoplasma felis in domestic cats. Vet Microbiol, 100(1-2), 77-82.



- Dewhurst, E., Carter, J., Scurrall, E. (2012). Laboratory investigation of ophthalmic disease. In: D. Gould & G. McLellan. (Eds.) *BSAVA Manual of Canine and Feline Ophthalmology* (3<sup>a</sup> Ed., pp. 51-60). Gloucester: British Small Animal Veterinary Association
- Fernandez, M., Manzanilla, E.G., Lloret, A., León, M., Thibault, J.C. (2017). Prevalence of feline herpesvirus-1, feline calicivirus, *Chlamydomphila felis* and *Mycoplasma felis* DNA and associated risk factors in cats in Spain with upper respiratory tract disease, conjunctivitis and/or gingivostomatitis. *J Feline Med Surg*, 19(4), 461-469.
- Gould, D. (2011). Feline herpesvirus-1: ocular manifestations, diagnosis and treatment options. *J Feline Med Surg*, 13(5), 333-346.
- Gruffydd-Jones, T.J., Jones, B.R., Hodge, H., Rice, M., Gething, M.A. (1995). Chlamydia infection in cats in New Zealand. *N Z Vet J*, 43(5), 201-203.
- Gruffydd-Jones, T.J., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., et al. (2009). *Chlamydomphila felis* infection. ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg*, 11(7), 605-609.
- Hartley, C. (2014). The conjunctiva and third eyelid. In: D. Gould & G. McLellan (Eds), *BSAVA Manual of Canine and Feline Ophthalmology* (3<sup>a</sup> Ed., pp.182-199). Gloucester: BSAVA.
- Hartmann, A.D., Hawley, J., Werckenthin, C., Lappin, M.R., Hartmann, K. (2010). Detection of bacterial and viral organisms from the conjunctiva of cats with conjunctivitis and upper respiratory tract disease. *J Feline Med Surg*, 12(10), 775-782.
- Helps, C., Reeves, N., Egan, K., Howard, P., Harbour, D. (2003). Detection of *Chlamydomphila felis* and feline herpesvirus by multiplex real-time PCR analysis. *J Clin Microbiol*, 41(6), 2734-2736.
- Helps, C.R., Lait, P., Damhuis, A., Bjornehammar, U., Bolta, D., Brovida, C., Chabanne, L., et al. (2005). Factors associated with upper respiratory tract disease caused by feline herpesvirus, feline calicivirus, *Chlamydomphila felis* and *Bordetella bronchiseptica* in cats: Experience from 218 European catteries. *Vet Rec*, 156(21), 669-673.
- Hillstrom, A., Tvedten, H., Kallberg, M., Hanas, S., Lindhe, A., Holst, B.S. (2012). Evaluation of cytologic findings in feline conjunctivitis. *Vet Clin Pathol*, 41(2), 283-290.
- Hoover, E.A., Kahn, D.E., Langloss, J.M. (1978). Experimentally induced feline chlamydial infection (feline pneumonitis). *Am J Vet Res*, 39(4), 541-547.
- Lobova, D., Kleinova, V., Konvalinova, J., Cerna, P., Molinkova, D. (2019). Laboratory diagnostics of selected feline respiratory pathogens and their prevalence in the Czech Republic. *Vet Med (Praha)*, 64(1), 25-32.
- Low, H.C., Powell, C.C., Veir, J.K., Hawley, J.R., Lappin, M.R. (2007). Prevalence of feline herpesvirus 1, *Chlamydomphila felis* and *Mycoplasma* spp DNA in conjunctival cells collected from cats with and without conjunctivitis. *Am J Vet Res*, 68(6), 643-648.
- Maggs, D.J. (2008). Conjunctiva. In: D.J. Maggs, P.E. Miller, R. Ofri (Eds.), *Slatter's fundamentals of veterinary ophthalmology*. (4<sup>a</sup> Ed., pp. 135-150). Missouri:Saunders Elsevier.
- McDonald, M., Willett, B.J., Jarrett, O., Addie, D.D. (1998). A comparison of DNA amplification, isolation and serology for the detection of *Chlamydia psittaci* infection in cats. *Vet Rec*, 143(4), 97-101.

- Nasissse, M.P., Guy, J.S., Stevens, J.B., English, R.V., Davidson, M.G. (1993). Clinical and laboratory findings in chronic conjunctivitis in cats: 91 cases (1983-1991). *J Am Vet Med Assoc*, 203(6), 834-837.
- Nguyen, D., Barrs, V.R., Kelman, M., Ward, M.P. (2018). Feline upper respiratory tract infection and disease in Austrália. *J Feline Med Surg*, DOI: 10.1177/1098612X18813248.
- Ollivier, F., Plummer, C., Barrie, K. (2007). Ophthalmic Examination and diagnostic. In: K. N. Gellat (Ed.), *Veterinary Ophthalmology* (4ª Ed., Vol. I, pp. 445-447). EUA: Blackwell Publishing.
- Ossewaarde, J.M., Meijer, A. (1999). Molecular evidence for the existence of additional members of the order Chlamydiales. *Microbiology*, 145 (2), 411-417.
- Prasse, K. W. & Young, K. (2010). The Eyes and associated structures. In R. L. Cowell, R. D. Tyler, J. H. Meinkoth, D. B. DeNicola (Eds), *Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat* (3ª Ed., pp. 151-155). USA: Mosby Elsevier.
- Ramsey, D.T. (2000). Feline Chlamydia and Calicivirus infections. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 30(5), 1015-1028.
- Rand, J. (2006). The cat with acute sneezing or nasal discharge. In: J. Rand (Ed.), *Problem-based feline medicine* (1ª Ed., pp. 5-18). Philadelphia: Saunders Elsevier.
- Raskin, R.E. (2016). Eyes and Adnexa. In: R.E. Raskin & D. J. Meyer (Eds.), *Canine and Feline Cytology. A color atlas and interpretation guide* (3ª Ed., pp. 406-429). Riverport Lane: Elsevier.
- Schulz, C., Hartmann, K., Mueller, R.S., Helps, C., Schulz, B.S. (2015). Sampling sites for detection of feline herpesvirus-1, feline calicivirus and Chlamydia felis in cats with feline upper respiratory tract disease. *J Feline Med Surg*, 17(12), 1012-1019.
- Sjödahl-Essén, T., Tidholm, A., Thorén, P., Persson-Wadman, A., Bölske, G., Aspán, A., Berndtsson, L. T. (2008). Evaluation of different sampling methods and results of real-time PCR for detection of feline herpes virus-1, Chlamydophila felis and Mycoplasma felis in cats. *Vet Ophthalmol*, 11(6), 375-80.
- Souza, J. O. T., Angêlo, F. F., Homem, L. A. S. (2010). Microbiota bacteriana conjuntival de felinos domésticos (Felis S. catus, Linnaeus, 1758) sadios da cidade de juiz de fora – MG. *Revista científica eletrônica de medicina veterinária*, Ano VIII, 15. Acedido em 14 de Janeiro de 2019 em [http://faef.revista.inf.br/imagens\\_arquivos\\_arquivos\\_destaque/IqLq42Smj1ovle0\\_2013-6-25-15-23-52.pdf](http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos_arquivos_destaque/IqLq42Smj1ovle0_2013-6-25-15-23-52.pdf).
- Sykes, J.E. (2004). Chlamydial infections. In: E.A. Chandler, C.J. Gaskell, R.M. Gaskell (Eds.), *Feline medicine and therapeutics*. (3ª Ed., pp 651-658). Oxford: Blackwell Publishing.
- Sykes, J.E. (2005). Feline chlamydiosis. *Clin Tech Small Anim Pract*, 20(2), 129-134.
- Turner, S.M. (2010a). Conjuntiva: introducción. In: F. Nind (Ed.), *Oftalmología de Pequeños Animales* (1ªEd., pp. 61-62). Barcelona, España: Elsevier España.
- Turner, S.M. (2010b). Conjuntivitis felina. In: F. Nind (Ed.), *Oftalmología de Pequeños Animales* (1ªEd., pp. 68-73). Barcelona, España: Elsevier España.
- Volopich, S., Benetka, V., Schwendenwein, I., Mostl, K., Sommerfeld-Stur, I., Nell B. (2005). Cytological findings, and feline herpesvirus DNA and Chlamydophila felis antigen detection rates in normal cats and cats with conjunctival and corneal lesions. *Vet Ophthalmol*, 8(1), 25-32.
- von Bomhard, W., Polkinghorne, A., Lu, Z.H., Vaughan, L., Vogtlin, A., Zimmermann, D.R., et al. (2003). Detection of novel Chlamydiae in cats with ocular disease. *Am J Vet Res*, 64(11), 1421–1428.

- Willis, M., Bounous, D.I., Hirsch, S. (1997). Conjunctival brush cytology: Evaluation of a new cytological collection technique in dogs and cats with a comparison to conjunctival scraping. *Vet. Comp. Ophthalmol*, 7(2), 74-81.
- Wills, J.M., Howard, P.E., Gruffydd-Jones, T.J., Wathes, C.M. (1988). Prevalence of *Chlamydia psittaci* in different cat populations in Britain. *J Small Anim Pract*, 29(6), 337-339.
- Silveira, J.A.G., Valente, P.C.L.G., Paes, P.R.O., Vasconcelos, A.V., Silvestre, B.T., Ribeiro, M.F.B. (2015). The first clinical and laboratory evidence of co-infection by *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia canis* in Brazilian dog. *Ticks and Tick-Borne Dis*, 6(3): 242-245
- Shields, K., Cumming, M., Rios, J., Wong, M.T., Zwicker, J.I., Stramer, S.L., et al. (2015). Transfusion- associated *Anaplasma phagocytophilum* infection in a pregnant patient with talassemia trait: A case report. *Transfus*, 55(4): 719-25.

